Aus der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen
Ehem. Direktor: Professor Dr. med. Walter Dick

Quantitativer Leistungsvergleich zwischen dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test und dem indirekten Coombs-Test im Bereich des Rh-Systems

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Helga Sauter
aus Tübingen

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0092

Aus der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen
Ehem. Direktor: Professor Dr. med. Walter Dick

Quantitativer Leistungsvergleich zwischen dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test und dem indirekten Coombs-Test im Bereich des Rh-Systems

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Helga Sauter
aus Tübingen

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. Walther Graumann

1. Berichterstatter: Dozent Dr. Werther Schneider
2. Berichterstatter: Professor Dr. Walter Dick

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

INHALT

		Seite
Einleitung	.....	1
Kreuzprobenverfahren	.....	4
Technik der Hochprotein-Slide-Kreuzprobe und ihre Modifikation nach W. Schneider	.....	7
Technik des Kreuzproben-Coombs-Testes	.....	9
Fragestellung	.....	11
Methodik	.....	12
Untersuchungsgut	.....	16
Untersuchungen und Ergebnisse	.....	18
I. Anti-D-Serum gegen D-Erythrocyten	.....	18
II. Anti-C-Serum gegen C-Erythrocyten	.....	29
III. Anti-c-Serum gegen c-Erythrocyten	.....	31
IV. Anti-E-Serum gegen E-Erythrocyten	.....	33
V. Anti-e-Serum gegen e-Erythrocyten	.....	35
Zusammenfassung und Diskussion	.....	38
Literaturverzeichnis	.....	44
Tabellarischer Anhang	.....	47

QUANTITATIVER LEISTUNGSVERGLEICH ZWISCHEN DEM HOCHPROTEIN-SLIDE-SCHAUKEL-TEST UND DEM INDIREKTEN COOMBS-TEST IM BEREICH DES RH-SYSTEMS.

Einleitung

Blutersatzmittel sind aus der modernen Medizin nicht mehr wegzudenken; sie haben in der Behandlung großer Blutverluste nach Unfällen, Operationen oder Geburten sowie in der Schockprophylaxe und Schockbekämpfung ihren festen Platz; auch Herzoperationen mit der Herz-Lungen-Maschine werden nur durch sie möglich.

Das vollwertigste "Blutersatzmittel" ist bis heute nach wie vor die Blutkonserve. Jedoch müssen bei jeder Bluttransfusion bestimmte Regeln strikt beachtet werden:

1) Im Bereich des ABO-Systems darf nur gruppengleiches Blut übertragen werden; die Blutgruppe von Spender und Empfänger muß übereinstimmen.

2) Es darf nur Rh-analoges Blut übertragen werden. Levine und Stetson[1] fanden 1939 bei einer Frau, die eine mazerierte, tote Frucht geboren hatte und anschließend außer 2 Bluttransfusionen noch 500 ml Blut vom Ehemann erhalten hatte, einen bei 37°C wirksamen Antikörper, der die Erythrocyten des Ehemanns agglutinierte. Levine und Mitarbeiter[2] folgerten hieraus, daß das Blut des Fetus, das einen vom Vater ererbten, dominanten Faktor enthielt, für die Isoimmunisierung verantwortlich war.

Wiener und Peters[3] untersuchten Transfusionszwischen-

fälle nach Transfusionen mit gruppengleichem Blut und konnten zeigen, daß die Erythrocyten der betreffenden Patienten rh-negativ waren und das Serum Immun-Antikörper enthielt. Mit diesen Untersuchungen war die Bedeutung eines neuen Faktors, des Rh-Faktors, erkannt.

Landsteiner und Wiener[4] gewannen den Rh-Antikörper durch Injektion roter Blutkörperchen des Rhesusaffen in Kaninchen aus dem Kaninchen-Serum und nannten ihn deshalb Anti-Rh. Der gebildete Antikörper wurde zur Testung menschlicher Erythrocyten benutzt, wobei 85 % der Proben eine positive Reaktion ergaben und folglich als Rh-positiv bezeichnet wurden.

Später konnte nachgewiesen werden, daß es sich um ein ganzes Rh-System handelt, welches aus 6 bzw. 8 Antigenmerkmalen besteht, die nach Fisher im europäischen Raum mit den Buchstaben CDE/cde, C^w und D^u bezeichnet werden. Im Bereich dieses Systems gibt es keine entsprechenden, korrespondierenden Antikörper, die natürlicherweise vorgebildet wären nach Art der regulären Antikörper des ABO-Systems. Diese Antikörper bilden sich erst auf immunbiologischem Wege nach Sensibilisierung eines Organismus durch Rh-inkompatibles Blut. Bekommt beispielsweise eine rh-negative (d) Person Rh-positives (D) Blut transfundiert, so kann durchschnittlich mit 50 % Wahrscheinlichkeit erwartet werden, daß nach einer gewissen Zeit im Serum dieser Person spezifische Immun-Antikörper nachzuweisen sind, die gegen das Merkmal D gerichtet sind. Erst wenn jetzt erneut Rh-positives (D) Blut transfundiert wird,

werden diese mit dem Faktor D versehenen Erythrocyten durch das bereitstehende Anti-D angegriffen und hämolysiert. Die Bestimmung und Berücksichtigung insbesondere des stark antigenwirksamen D-Faktors ist daher vor jeder Transfusion sowohl beim Spender als auch beim Empfänger von großer Wichtigkeit.

3) Nach den Richtlinien, die von der Deutschen Gesellschaft für Blut-Transfusion[5] ausgearbeitet und als verbindlich angegeben wurden, muß der für eine Bluttransfusion verantwortliche Arzt sich vor der Durchführung derselben davon überzeugen, daß im Serum des Empfängers keine Antikörper vorliegen, die gegen die Erythrocyten des Spenders gerichtet sind. Dazu wird im allgemeinen eine sog. Kreuzprobe vorgenommen, wobei Serum des Empfängers mit Erythrocyten des Spenders (Mayor-Test) und Serum des Spenders mit Erythrocyten des Empfängers (Minor-Test) unter bestimmten Bedingungen in vitro konfrontiert wird (Holländer[6]). Auf den Minor-Test kann dabei meist verzichtet werden, da Antikörper im Serum des Spenders sehr selten sind[7-14]. Bei der serologischen Untersuchung des Spenderblutes müssen zudem solche Antikörper auffallen, was ein Ausscheiden des Blutes zu Spenderzwecken zur Folge hat.

Eine gute Kreuzprobe muß also in der Lage sein, irgendwelche Antikörper (reguläre wie irreguläre Immunantikörper) nachzuweisen, die gegen die Erythrocyten gerichtet sind, die man zu transfundieren beabsichtigt. Die Vielgestalt der möglichen und bekannten Antikörper und ihre verschiedenen Untersuchungsoptima bedingen aber, daß diese Forderung

durch ein einziges Kreuzverfahren nicht voll erfüllt werden kann. In der Routine-Praxis muß man sich daher für eine Kompromißlösung entscheiden, die eine weitestgehende Sicherheit bietet, daß zumindest die wichtigsten und gefährlichlichsten Antikörper (darunter in erster Linie jene im Bereich des Rh-Systems) zuverlässig erkannt werden. Die Grenzen werden durch ein vernünftiges Verhältnis zwischen Zeitaufwand, technischer Einfachheit und leichter Ablesbarkeit der Kreuzproben gezogen.

Kreuzprobenverfahren

Die Kreuzprobe wird i.a. als Hochprotein-Slide-Test angesetzt. Es handelt sich dabei um ein Reaktionsgemisch von Empfängerserum mit Spendererythrocyten und einem Konglutininzusatz (Rinderalbumin) auf einem Objektträger (Mayor-Test). In dem konglutininaktiven Milieu reagieren sowohl die kompletten, agglutinierenden Antikörper des ABO-Systems als auch die inkompletten, blockierenden Immun-Antikörper des Rh-Systems und anderer Blutgruppensysteme. Da die optimale Temperatur der Immun-Antikörper gleich der der Körpertemperatur ist, soll der Kreuzprobenansatz im Brutschrank bei 37°C abgestellt werden. Nach 30' Inkubationszeit kann das Vorhandensein von Antikörpern an einer Agglutination der Spendererythrocyten gesehen werden. Zur Erfassung schwachtitriger Antikörper des ABO-Systems sollte ein 2. Kreuzprobenansatz bei Zimmertemperatur ohne Konglutininzusatz mitgeführt werden, da hiermit bessere Versuchsbedin-

gungen für diese Art von Antikörpern gegeben sind.

In manchen Fällen ist die Ergänzung der Kreuzprobe nach dem Hochprotein-Slide-Verfahren durch den indirekten Coombs-Test empfehlenswert. Dies ist vor allem notwendig, wenn der betreffende Empfänger bereits mehrere Transfusionen erhalten hatte, also damit zu rechnen ist, daß sich bei ihm gegenüber dem Spenderblut wirksame Antikörper entwickelt haben, die nur durch den indirekten Coombs-Test zu erfassen sind, z.B. Kryptagglutinoide, die weder im Kochsalz- noch in Albuminmilieu reagieren. Der indirekte Coombs-Test ist ein sehr empfindlicher Nachweis für inkomplette Antikörper und Autoimmunantikörper.

Zum 1. Mal wurde dieser Test von Moreschi[15] beschrieben und von Coombs, Mourant und Race[16,17] wiederentdeckt; sie entwickelten ihn zur besseren Untersuchung von Rh-Antikörpern. Durch Injektion von Human-Globulinen in einen tierischen Organismus gewannen sie aus dessen Blutserum ein Anti-Human-Globulin-Serum, das sog. Coombs-Serum. Durch eine Reaktion des tierischen Anti-Human-Globulin-Serums mit den an die Erythrocyten gehefteten Antikörpern gelang es ihnen, die Antikörper nachzuweisen.

Der indirekte Coombs-Test besteht aus 2 Stufen:

1) der Inkubation von Antikörpern und spezifischen Erythrocyten und

2) dem Nachweis der anhaftenden Antikörper (Human-Globuline) durch Hinzugeben von Anti-Human-Globulin-Serum. Die Antikörper samt der an sie gebundenen Erythrocyten werden präcipitiert, was als Agglutination sichtbar wird.

Der indirekte Coombs-Test dient dem Nachweis von Antikörpern bei einer Kreuzprobe oder der Prüfung auf das Vorhandensein eines bestimmten Antigenes mit Hilfe eines bekannten Antikörper-Serums. Er erfaßt alle Antikörper der Globulin-Fraktion des Serums.

Eine äußerst empfindliche Methode zum Nachweis von Antikörpern wurde im Enzym-Test entwickelt. Arbeiten von Wheeler u.a.[18] sowie von Morton und Pickles[19] berichten über die bessere Nachweismöglichkeit von Rh-Antikörpern mit trypsinvorbehandelten Erythrocyten. Spätere Versuche ergaben, daß auch Papain[20], Ficin[21] und Bromelin[22] anstelle von Trypsin verwendet werden können. Allerdings stellte sich heraus, daß außerhalb des Rh-Systems nicht alle Antikörper in dieser Methode reagieren. K. Hummel[23] erklärt die größere Empfindlichkeit des Enzym-Testes dadurch, daß durch die Fermentierung wassertragende Gruppen an der Oberfläche der Erythrocyten abgespalten werden, und damit die Agglutinationskraft von 7-S-Antikörpern bei auf solche Art vorbehandelten Zellen erheblich gesteigert ist. Der Nachteil der Methode liegt darin, daß sie nicht alle Antikörper zuverlässig erfaßt und in dem erheblichen Zeitaufwand zur Durchführung des Testes.

Zum Nachweis aller bekannten Antikörper wird der Breitspektrum-Verträglichkeitstest als ideal angegeben. Er wird in 3 Phasen durchgeführt: Der Protein-, Thermo- und Antiglobulin-Phase. Die Protein-Phase erfaßt Unverträglichkeiten im Bereich des ABO-Systems und teilweise des Rh-Systems; niedrigtitrige Rh-Antikörper und andere Immunantikörper,

die eine Inkubation bei 37°C erfordern, werden in der Thermo-Phase aufgedeckt; die Antiglobulin-Phase schließlich stellt Antikörper wie Anti-Kell, Anti-Lewis, Anti-Duffy und Anti-Kidd dar, die mit anderen Methoden schlecht erfaßt werden.

In dringlichen Situationen ist den 3 letztgenannten Methoden der Hochprotein-Slide-Test vorzuziehen. Sein Vorteil liegt in der wesentlich einfacheren Technik, dem verhältnismäßig schnellen Verfahren und dem zuverlässigen Aussagewert über das Vorhandensein der klinisch wichtigsten Antikörper. Im Folgenden soll die Methode des Hochprotein-Slide-Testes und die des indirekten Coombs-Testes bei der Kreuzprobe beschrieben werden.

Technik der Hochprotein-Slide-Kreuzprobe

1) Objektträger mit Fettstift bezeichnen, links mit "E" (Empfänger), rechts mit "S" (Spender).
2) 2 Tropfen Empfängerserum nebeneinander auf den Objektträger tropfen.
3) Zu jedem Tropfen des Empfängerserums 1 Tropfen 20 %iges Rinderalbumin.
4) Eine stecknadelkopfgroße Menge plasmaarmes Erythrocytensediment des Spenders in den rechten mit "S" bezeichneten Tropfen verrühren, wobei der Tropfen auf einen Durchmesser von 8-10 mm ausgebreitet wird.
5) Empfängerblutkörperchen werden wie unter 4) in den linken mit "E" bezeichneten Tropfen verrührt (Kontrolle auf Autoantikörper).
6) Objektträger in eine feuchte Kammer legen und für 30' bei 37°C im Brutschrank abstellen.

7) Die Beurteilung der Reaktion erfolgt sofort nach der Inkubationszeit makroskopisch vor einer Lichtquelle unter leichtem Schaukeln des Objektträgers.

Ablesung:

Die Kreuzprobe ist negativ, wenn in dem mit "S" bezeichneten Gemisch keine Agglutination eintritt. Eine Transfusion kann durchgeführt werden.

Die Kreuzprobe ist positiv, wenn in dem mit "S" bezeichneten Gemisch eine Agglutination eintritt, die in dem mit "E" bezeichneten Tropfen nicht beobachtet wird. Eine Transfusion darf nicht durchgeführt werden.

Feine Agglutinationen in dem rechten Tropfen "S" können vernachlässigt werden, wenn sie in dem linken Tropfen "E" in gleicher Stärke oder noch stärker vorhanden sind. Es handelt sich dann um Pseudoagglutinationen oder um Reaktionen, die durch Kälte- oder Autoantikörper zustande kamen. Eine Transfusion kann durchgeführt werden.

Untersuchungen von W. Schneider und P. Cornils ergaben, daß die Empfindlichkeit des Hochprotein-Slide-Testes steigt, wenn das Reaktionsgemisch während der gesamten Inkubationszeit gleichmäßig bewegt wird. Die Empfindlichkeit dieses Hochprotein-Slide-Schaukel-Testes nach W. Schneider lag im Bereich des ABO-Systems durchschnittlich um 1 Verdünnungsstufe und im Bereich des Rh-Systems um 2 ganze Verdünnungsstufen einer geometrischen Verdünnungsreihe des antikörperhaltigen Serums höher.

W. Schneiders Untersuchungen basieren auf folgender Überlegung: Die Stärke eines Erythrocytenagglutinates wird

im wesentlichen vom Antikörpertiter und der Agglutinabilität der Erythrocyten bestimmt. Die Antigen-Antikörper-Reaktion findet gleich nach Ansetzen des Reaktionsgemisches statt, z.T. wohl auf Grund einer Antigen-Avidität der Antikörper. Zur Bildung eines Agglutinates müssen nun die mit Antikörpern beladenen Erythrocyten zueinander finden. Dies kann nach W. Schneider auf einfache Art und Weise erleichtert werden: man hält das Reaktionsgemisch während der Inkubationszeit durch sanftes Schaukeln ständig in Bewegung. Die Empfindlichkeit des Hochprotein-Slide-Testes im Nachweis von Antikörpern wird durch diesen Kunstgriff wesentlich gesteigert. Über ein ständiges Schaukeln der Kreuzprobe während der Inkubationszeit ist in der Literatur nichts zu finden, allein P. Dahr[24] und M. Kindler[25] empfehlen ein leichtes Schaukeln der Kreuzprobe vor dem Ablesen.

Der von Coombs entwickelte Anti-Human-Globulin-Test gilt als sehr empfindliche Methode zum Nachweis von Rh-Antikörpern.

Technik des Kreuzproben-Coombs-Testes

Vorbereitung:

(Die positive Kontrolle braucht nicht angesetzt zu werden, wenn schon mit Antikörpern beladene Kontroll-Blutkörperchen vorrätig sind.)

1) Je 1 Zentrifugen-Röhrchen beschriften mit "E", "S" und "+" (positive Kontrolle).
2) In Röhrchen "E" und "S" je 5 Tropfen Empfängerserum, in das Kontroll-Röhrchen 2 Tropfen inkomplettes Anti-

Rh-Serum und 3 Tropfen physiologische Kochsalzlösung.

3) In Röhrchen "E" 5 Tropfen einer 3-5 %igen Aufschwemmung der Empfängerblutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung.

4) In Röhrchen "S" 5 Tropfen einer 3-5 %igen Aufschwemmung der Spenderblutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung.

5) In das Kontroll-Röhrchen 5 Tropfen einer 3-5 %igen Aufschwemmung bekannter Rh-positiver Blutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung.

6) Röhrchen schütteln und für 30-60' bei 37°C inkubieren.

7) Röhrchen mit physiologischer Kochsalzlösung füllen (nur frische, eiweißfreie Kochsalzlösung benutzen!).

8) Kurz scharf zentrifugieren.

9) Überstehende Kochsalzlösung abgießen, wieder neu mit Kochsalzlösung auffüllen, nochmals zentrifugieren und abgießen (insgesamt dreimal waschen).

10) 5 Tropfen physiologische Kochsalzlösung in jedes Röhrchen tropfen und aufschütteln.

Ausführung:

1) Auf Objektträger oder Glasplatte 3 Tropfen Antiglobulin-Serum tropfen.

2) Darunter 3 Tropfen physiologische Kochsalzlösung (Blutkörperchen-Kontrolle).

3) In linke Reihe oben und unten (d.h. in Antiglobulin-Serum und in Kochsalzlösung) je 1 Tropfen Blutkörperchen-Aufschwemmung aus Röhrchen "E", in mittlere Reihe je 1 Tropfen aus Röhrchen "S", in rechte Reihe je 1 Tropfen aus Röhrchen "+".

4) Tropfen verrühren, ausbreiten und schaukeln. Ablesung erfolgt nach 2-3'.

Ablesung:

Die positive Kontrolle rechts oben zwischen mit Antikörpern beladenen Kontroll-Blutkörperchen und Antiglobulin-Serum muß immer agglutiniert sein. Ist die dazugehörige Blutkörperchen-Kontrolle in physiologischer Kochsalzlösung darunter auch agglutiniert, so enthält das inkomplette Anti-Rh-Serum auch komplette Antikörper.

Negativ ist die Kreuzprobe, wenn nur in der positiven Kontrolle rechts eine Agglutination erfolgt.

Positiv ist die Kreuzprobe, wenn außerdem zwischen Blutkörperchen "S" und Antiglobulin-Serum in der Mitte eine Agglutination zu sehen ist. Das Empfängerserum enthält inkomplette Isoantikörper gegen das Spenderblut, wenn die dazugehörige Kochsalzkontrolle negativ bleibt, komplette Isoantikörper, wenn diese positiv wird.

Autoantikörper im Empfängerserum sind vorhanden, wenn nicht nur wie bei der positiven Kreuzprobe eine Agglutination mit den Spenderblutkörperchen in der Mitte, sondern auch eine mit den Empfängerblutkörperchen links erfolgt. Diese sind inkomplett, wenn nur die Probe mit dem Antiglobulin-Serum oben positiv wird, und komplett, wenn auch die dazugehörige Kochsalz-Kontrolle positiv wird.

Fragestellung

In dieser Arbeit soll die Empfindlichkeit des nach W. Schneider modifizierten Hochprotein-Slide-Testes und die des indirekten Coombs-Testes im Nachweis von Antikörpern

des Rh-Systems vergleichend untersucht werden. Als Vergleichswerte dienen die jeweils nach beiden Methoden festgestellten Grenzen des Antikörpertiters der untersuchten Seren.

Durch Verwendung von mehreren Coombs-Seren (8) in jeder Untersuchungsreihe soll uns darüberhinaus die Möglichkeit gegeben werden, auch eine Aussage über die Leistungsfähigkeit der einzelnen Anti-Human-Globulin-Seren zu machen, die zur Zeit im Handel sind. Die Firmennamen werden als "A", "B", "C" usw. chiffriert.

Methodik

Die verwendeten antikörperhaltigen Seren des Rh-Systems sind teilweise von der Industrie bezogene Seren, teilweise stammen sie aus Blutproben der Blutzentrale, in denen Antikörper gefunden wurden. Die zur Kreuzung benötigten Testerythrocyten mit entsprechenden Rh-Merkmalen werden ebenfalls Blutproben der Blutzentrale entnommen.

Aus den antikörperhaltigen Seren wird zunächst mit antikörperfreiem AB-Serum eine geometrische Verdünnungsreihe bis zur Stufe 1 : 2000 hergestellt. Die einzelnen antikörperhaltigen Stufen dieser Verdünnungsreihe werden zum Ansatz eines nach W. Schneider modifizierten Hochprotein-Slide-Testes und zum Ansatz eines indirekten Coombs-Testes als Objektträger- und als Röhrchen-Test verwendet. Die Bedingungen für den nach W. Schneider modfizierten Hochprotein-Slide-Test und den indirekten Coombs-Test werden in allen durchgeführten Kreuzproben gleich gehalten; auch werden in

allen Versuchen die gleichen Mengen an antikörperhaltigen Seren und gleichprozentige Erythrocytensuspensionen verwendet.

Zur Durchführung des Hochprotein-Slide-Schaukel-Testes kreuzen wir je 1 Tropfen des antikörperhaltigen Serums jeder Verdünnungsstufe mit je 1 Tropfen einer frisch angesetzten 2 %igen Erythrocytensuspension in 20 %igem Rinderalbumin. Die Tropfengröße wird durch senkrechtes Halten und Verwendung gleich großer Pipetten (0,2 ml) standardisiert. Die Objektträger mit den Reaktionsgemischen bringen wir in eine feuchte Kammer und anschließend für 30' bei 37°C in den Brutschrank. Hier werden die Reaktionsgemische auf einer zu diesem Zweck konstruierten Schaukelebene ständig in Bewegung gehalten. Diese besteht aus einer rechteckigen Platte, die durch einen elektrischen Motor dauernd mit der gleichen Frequenz (20/min) und einer Amplitude von 2 cm am äußeren Rand bewegt wird. Die Ablesung erfolgt sofort nach der Inkubation makroskopisch vor einer Lichtquelle und mikroskopisch bei mittlerer Vergrößerung.

Zur Durchführung des indirekten Coombs-Testes werden 0,2 ml antikörperhaltiges Serum jeder Verdünnungsstufe mit der gleichen Menge einer 10 %igen Erythrocytensuspension in physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 45' bei 37°C entfernen wir sämtliche noch vorhandenen Proteine durch dreimaliges Waschen der Erythrocyten mit physiologischer Kochsalzlösung. Von dem übrig bleibenden Sediment jeder Verdünnungsstufe mischen wir je

1 Tropfen mit 1 Tropfen Coombs-Serum auf einem Objektträger. Dies führen wir mit mehreren Coombs-Seren verschiedener Firmen durch. Nach 5' langen, gleichmäßigen Schaukeln erfolgt dann die Ablesung wieder makroskopisch vor einer Lichtquelle und mikroskopisch bei mittlerer Vergrößerung. Zum Vergleich führen wir mit dem Rest des Erythrocyten-Sedimentes außerdem noch den Röhrchen-Coombs-Test durch. Hierfür wird zu dem gewaschenen Erythrocyten-Sediment 1 Tropfen Coombs-Serum in das Röhrchen gegeben, durch Schütteln gut gemischt und anschließend während 1-2' bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Inhalt des Röhrchens wird makroskopisch auf Agglutination beobachtet, indem das Sediment vor einer Lichtquelle leicht aufgeschüttelt wird.

Den indirekten Objektträger-Coombs-Test führen wir mit mehreren Coombs-Seren durch, da die Gebrauchsverdünnung der einzelnen Coombs-Seren von verschiedenen Firmen unterschiedlich ist und der positive Antikörpernachweis in Funktion dieser Gebrauchsverdünnung stehen kann. Außerdem wird uns dadurch die Möglichkeit gegeben, Aussagen über die Leistungsfähigkeit der einzelnen Anti-Human-Globulin-Seren verschiedener Firmen zu machen.

Die Leistungsfähigkeit der beiden Methoden beurteilen wir nach der jeweils festgestellten Titerhöhe des Serums. In den Tabellen beziehen wir uns auf die mikroskopisch abgelesenen Werte, die makroskopischen sind durch Absetzen der Linien angedeutet.

Zu erwähnen bleibt noch, daß es nach dem Ansatz des Hochprotein-Slide-Schaukel-Testes und des indirekten Coombs-

Testes keine Verdünnungsstufe 1 : 1 mehr gibt, da wir bei beiden Methoden jeweils die gleiche Menge antikörperhaltigen Serums mit der gleichen Menge Erythrocytensuspension versetzen. Die Verdünnung verschiebt sich um eine Stufe, die 1. Stufe der Reihe wird zu einer 1 : 2 - Verdünnung.

Untersuchungsgut

I. Anti-D-Serum gegen D-Erythrocyten:

1. Firmen-Anti-D-Serum:

7 Versuchsreihen mit dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test

23[x] Versuchsreihen mit dem indir. Objektträger-Coombs-Test

7 Versuchsreihen mit dem indir. Röhrchen-Coombs-Test

2. unausgewählte Anti-D-Seren:

27 Versuchsreihen mit dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test

129[x] Versuchsreihen mit dem indir. Objektträger-Coombs-Test

27 Versuchsreihen mit dem indir. Röhrchen-Coombs-Test

3. Anti-D-Serum von S.:

12 Versuchsreihen mit dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test

57[x] Versuchsreihen mit dem indir. Objektträger-Coombs-Test

12 Versuchsreihen mit dem indir. Röhrchen-Coombs-Test

II. Anti-C-Serum gegen C-Erythrocyten:

14 Versuchsreihen mit dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test

70[x] Versuchsreihen mit dem indir. Objektträger-Coombs-Test

14 Versuchsreihen mit dem indir. Röhrchen-Coombs-Test

III. Anti-c-Serum gegen c-Erythrocyten:

14 Versuchsreihen mit dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test

70[x] Versuchsreihen mit dem indir. Objektträger-Coombs-Test

14 Versuchsreihen mit dem indir. Röhrchen-Coombs-Test

IV. Anti-E-Serum gegen E-Erythrocyten:

16 Versuchsreihen mit dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test

80[x] Versuchsreihen mit dem indir. Objektträger-Coombs-Test

16 Versuchsreihen mit dem indir. Röhrchen-Coombs-Test

V. Anti-e-Serum gegen e-Erythrocyten:

14 Versuchsreihen mit dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test

70[x] Versuchsreihen mit dem indir. Objektträger-Coombs-Test

14 Versuchsreihen mit dem indir. Röhrchen-Coombs-Test

x = Die größere Zahl der indirekten Objektträger-Coombs-Teste ergibt sich dadurch, daß bei jeder Verdünnungsreihe mehrere Objektträger-Coombs-Teste mit verschiedenen Coombs-Seren durchgeführt wurden.

Untersuchungen und Ergebnisse

I. Anti-D-Serum gegen D-Erythrocyten:

Bei unseren Untersuchungen gehen wir von Anti-D-Seren der Industrie und unausgewählten Anti-D-haltigen Seren aus, die in der Blutzentrale durch Kreuzproben entdeckt wurden. Wir testen insgesamt 35 verschiedene Seren sowohl in dem nach W. Schneider modifizierten Hochprotein-Slide-Test als auch im indirekten Coombs-Test.

Von jedem Anti-D-haltigen Serum wird eine geometrische Verdünnungsreihe bis zur Stufe 1 : 2000 hergestellt; zur Verdünnung nehmen wir antikörperfreies AB-Serum. Eine 1 : 2 - Verdünnung erhalten wir durch Mischen von 0,4 ml Anti-D-Serum mit 0,4 ml AB-Serum, von dieser werden wieder 0,4 ml entnommen und zur Herstellung der nächsten Verdünnungsstufe ebenfalls mit 0,4 ml AB-Serum versetzt usw. bis zur Stufe 1 : 2000. Mit jeder Verdünnungsstufe wird nun der Hochprotein-Slide-Schaukel-Test nach W. Schneider und der indirekte Coombs-Test durchgeführt.

Zuerst setzen wir die Kreuzprobe nach dem Hochprotein-Slide-Verfahren an. Je 1 Tropfen Anti-D-haltiges Serum jeder Verdünnungsstufe wird mit einem gleich großen Tropfen einer 2 %igen Erythrocytensuspension in 20 %igem Rinderalbumin mit einem sauberen Stäbchen auf einem Objektträger vermischt und über eine Fläche von etwa 10 mm Durchmesser ausgebreitet (als eine 100 %ige Erythrocytensuspension

setzen wir eine Suspension mit 5 000 000 Erythrocyten/mm^3 fest, eine 2 %ige Suspension enthält also 100 000 Erythrocyten/mm^3, eine 10 %ige 500 000 Erythrocyten/mm^3). Die Objektträger werden in feuchte Kammern gebracht und für 30' bei 37°C auf der schon beschriebenen Schaukel im Brutschrank geschaukelt. Danach erfolgt die Ablesung auf Agglutination makroskopisch vor einer Lichtquelle und mikroskopisch bei mittlerer Vergrößerung.

Zum Ansatz des indirekten Coombs-Testes werden 0,2 ml Anti-D-haltiges Serum jeder Verdünnungsstufe und 0,2 ml einer 10 %igen Erythrocytensuspension in physiologischer Kochsalzlösung in einem Röhrchen gemischt. Die gut verschlossenen Röhrchen werden für 45' bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Daran anschließend erfolgt das Waschen der nun mit Antikörpern beladenen Erythrocyten, indem man die Röhrchen mit physiologischer Kochsalzlösung auffüllt und suspendiert, zentrifugiert und die überstehende Kochsalzlösung abgießt; dieser Waschvorgang wird dreimal durchgeführt. Nach dem letzten Waschen wird möglichst alle Kochsalzlösung entfernt. Für den indirekten Objektträger-Coombs-Test wird nun 1 Tropfen Erythrocytensediment auf einen Objektträger gegeben und dazu 1 Tropfen Anti-Human-Globulin-Serum, beides gut gemischt und auf einer Fläche von ca. 10 mm Durchmesser ausgebreitet. Die Objektträger mit den Reaktionsgemischen werden in feuchte Kammern gebracht und für 5' geschaukelt. Die Ablesung erfolgt wieder makroskopisch vor einer Lichtquelle und mikroskopisch bei mittlerer Vergrößerung. Diesen Objektträger-

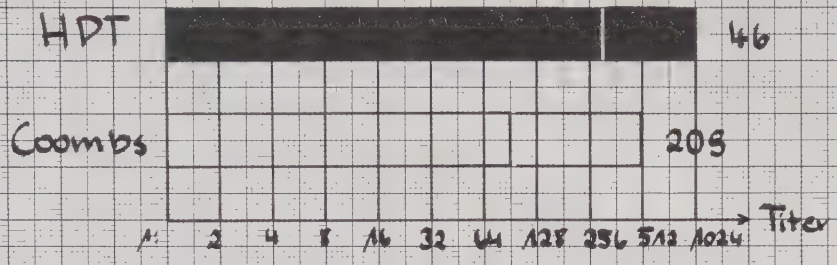
Coombs-Test führen wir mit mehreren verschiedenen Coombs-Seren durch. Den letzten Rest des Erythrocytensedimentes verwenden wir für den indirekten Röhrchen-Coombs-Test. Hier wird 1 Tropfen Anti-Human-Globulin-Serum zu dem Erythrocytensediment in das Röhrchen gegeben, durch Schütteln gut gemischt und für 1-2' bei 1000 U/min zentrifugiert. Die Agglutination in den Röhrchen kann dann allerdings nur makroskopisch durch Aufschütteln vor einer Lichtquelle beurteilt werden.

Ergebnisse: Bei der Beurteilung beider Methoden beziehen wir uns auf die mikroskopisch ermittelte Titerhöhe des Serums. Betrachten wir den Gesamtdurchschnitt der 46 Hochprotein-Slide-Schaukel-Teste und den der 209 indirekten Objektträger-Coombs-Teste, so erweist sich der nach W. Schneider modifizierte Hochprotein-Slide-Test um durchschnittlich 1 Stufe empfindlicher im Nachweis eines Anti-D. Der Gesamtdurchschnitt aus den Ergebnissen der 46 indirekten Röhrchen-Coombs-Teste, welche nur makroskopisch abgelesen werden konnten, ergibt einen um 2 Stufen schlechteren Wert als der der indirekten Objektträger-Coombs-Teste, welche mikroskopisch abgelesen wurden. (Tab.: 1)

ad 1. Firmen-Anti-D-Serum gegen D-Erythrocyten:

Bei 7 Kreuzproben nach dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test und 23 Kreuzproben nach dem indirekten Objektträger-Coombs-Test war der Coombs-Test in 1 Versuch um 1 Stufe besser, in 5 Versuchen gleich, in 5 Versuchen um 1 Stufe, in 3 Versuchen um 2 Stufen, in 6 Versuchen um 3 Stufen,

Tab.: 1



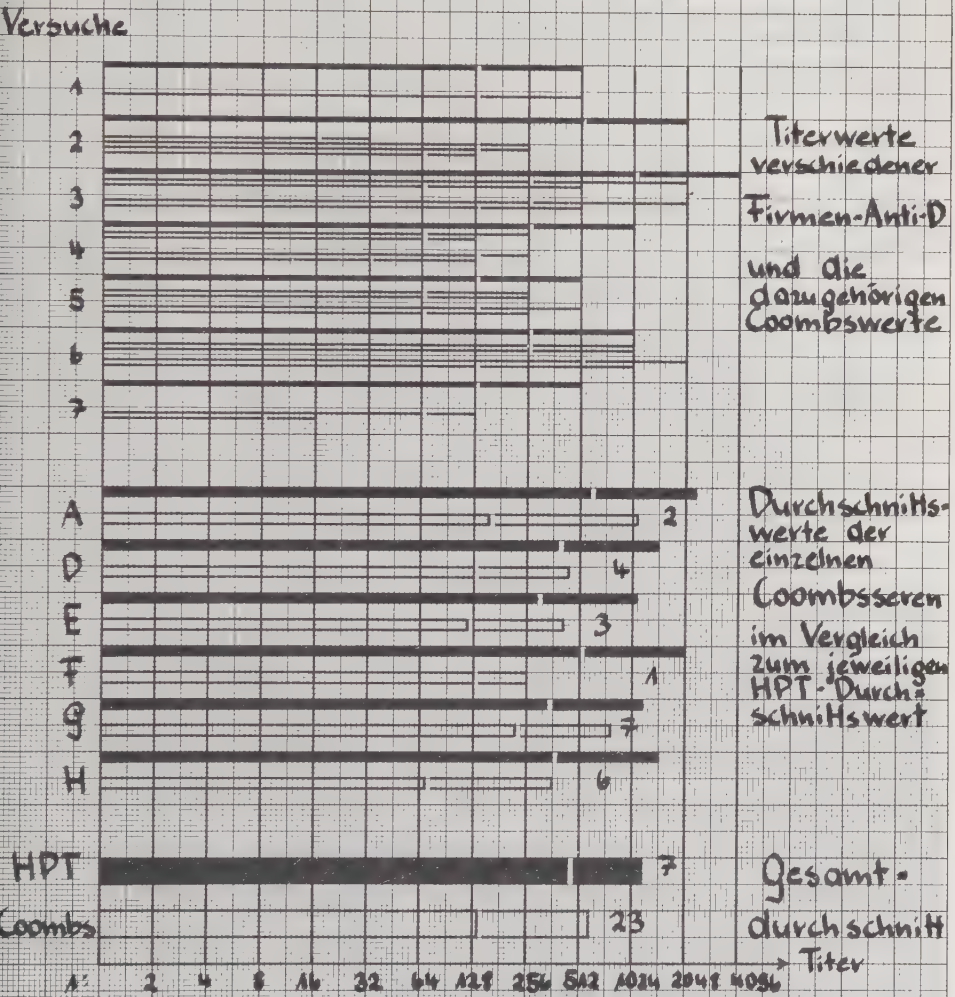
Gesamtdurchschnittswerte der HDT und Coombstests aller verwendeten Anti-D

in 1 Versuch um 4 Stufen und in je 1 Versuch um 5 und um 6 Stufen schlechter.

Nach Errechnen der Durchschnittswerte der mit den einzelnen Coombs-Seren durchgeführten Objektträger-Coombs-Teste im Vergleich zum Durchschnittswert der dazugehörigen Hochprotein-Slide-Schaukel-Teste läßt sich feststellen, daß die mit dem Coombs-Serum "G" durchgeführten Teste dem nach W. Schneider modifizierten Hochprotein-Slide-Test in der Empfindlichkeit am nächsten kommen. Der durchschnittlich erreichte Titerwert des Hochprotein-Slide-Schaukel-Testes ist 1390, der des indirekten Objektträger-Coombs-Testes 580, was einem Titerunterschied von etwa 1 Stufe entspricht. Der Durchschnittswert des indirekten Röhrchen-Coombs-Testes ist 210, ungefähr 1 Stufe schlechter als der indirekte Objektträger-Coombs-Test. (Tab.: 2)

Die einzelnen Hochprotein-Slide-Schaukel-Test-Werte sind in den Tabellen als 1 mm breite Striche dargestellt; die dünn ausgezogenen, im Abstand von 1 mm daruntersteheden Linien bedeuten die Ablesungen aus den dazugehörigen indirekten Objektträger-Coombs-Testen mit den verschiedenen Coombs-Seren. Da nicht alle Versuche mit den gleichen Coombs-Seren durchgeführt wurden, ist die Reihenfolge entsprechend der bei den Durchschnittswerten der einzelnen Coombs-Seren angeführten: "A", "B", "C" ... Nicht ausgezogene Linien bedeuten, daß das betreffende Coombs-Serum nicht verwendet wurde. Die Nummerierung 1, 2, 3 ... entspricht den von verschiedenen Firmen bezogenen Anti-D-Seren. Beispiel: In dem zuoberst angeführten Versuch wurde zur Kreuzprobe

Tab. 2

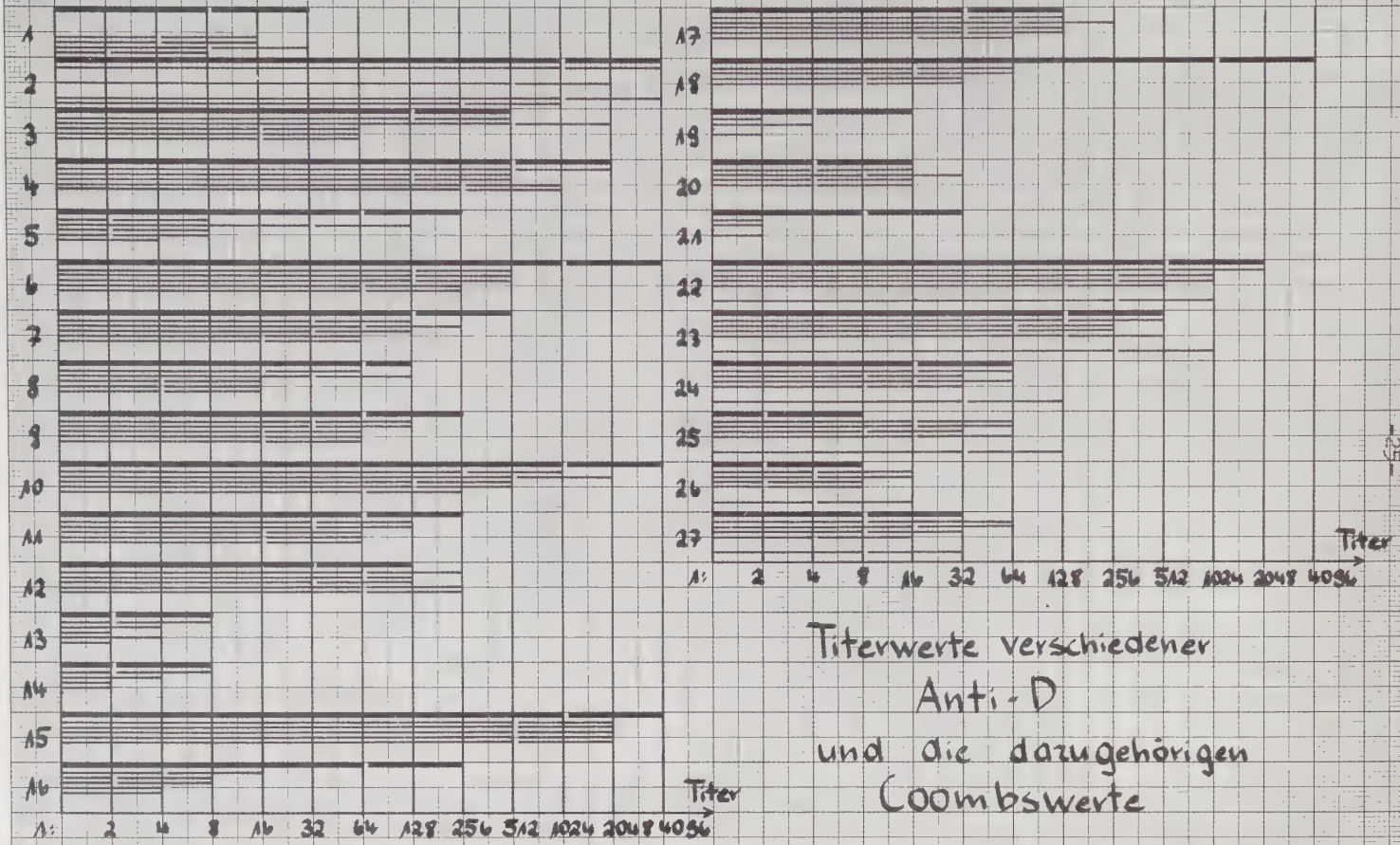

Versuche
1
2
3
4
5
6
7
A
D
E
F
G
H
HPT
Coombs
2
4
3
1
7
6
7
23
1:
2
4
8
16
32
64
128
256
512
1024
2048
4096
Titer
Titerwerte verschiedener Firmen-Anti-D und die dazugehörigen Coombswerte
Durchschnittswerte der einzelnen Coombsseren im Vergleich zum jeweiligen HPT-Durchschnittswert
Gesamtdurchschnitt

nach dem indirekten Objektträger-Coombs-Test demnach ein Anti-D-Serum der Firma 1 und ein Antiglobulin-Serum "G" genommen; im nächsten daruntersteheden Versuch wurden mehrere indirekte Coombs-Teste mit den Antiglobulin-Seren "E", "F", "G" und "H" durchgeführt. Um die mit einem bestimmten Coombs-Serum erzielten Werte mit denen des Hochprotein-Slide-Testes in der nach W. Schneider modifizierten Weise vergleichen zu können, sind die Durchschnittswerte aus allen mit dem betreffenden Coombs-Serum durchgeführten Versuchen und den dazugehörigen Hochprotein-Slide-Schaukel-Testen in der Tabelle darunter gesondert dargestellt. Zuunterst in der Tabelle sind die Gesamtdurchschnittswerte aller Hochprotein-Slide-Schaukel-Teste und aller indirekten Objektträger-Coombs-Teste aufgezeichnet. Der indirekte Röhrchen-Coombs-Test ist nicht mit in die Tabellen eingetragen.

ad 2. Unausgewählte Anti-D-Seren gegen D-Erythrocyten:

Bei 27 Kreuzproben nach dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test und 129 Kreuzproben nach dem indirekten Objektträger-Coombs-Test ist der Coombs-Test in 1 Versuch um 4 Stufen, in 3 Versuchen um 3 Stufen, in 2 Versuchen um 2 Stufen, in 12 Versuchen um 1 Stufe besser, in 25 Versuchen sind die Ergebnisse gleich, in 30 Versuchen ist der Coombs-Test um 1 Stufe, in 19 Versuchen um 2 Stufen, in 16 Versuchen um 3 Stufen, in 8 Versuchen um 4 Stufen, in 6 Versuchen um 5 Stufen, in 5 Versuchen um 6 Stufen und in 2 Versuchen um 7 Stufen schlechter.

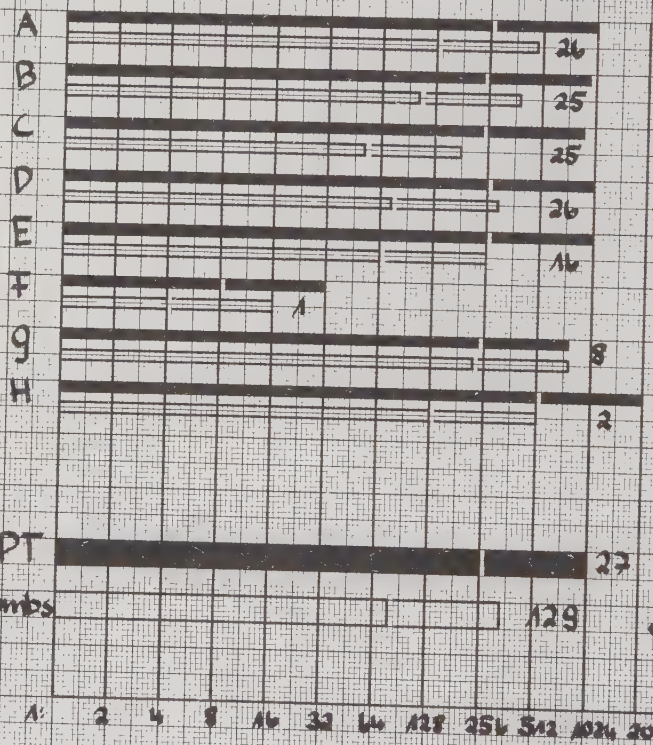
Tab. 3



Titerwerte verschiedener
Anti-D
und die dazugehörigen
Coombswerte

125

Tab. 4



Durchschnittswerte der einzelnen Coombsseren im Vergleich zum jeweiligen HPT-Durchschnittswert

Gesamtdurchschnitt

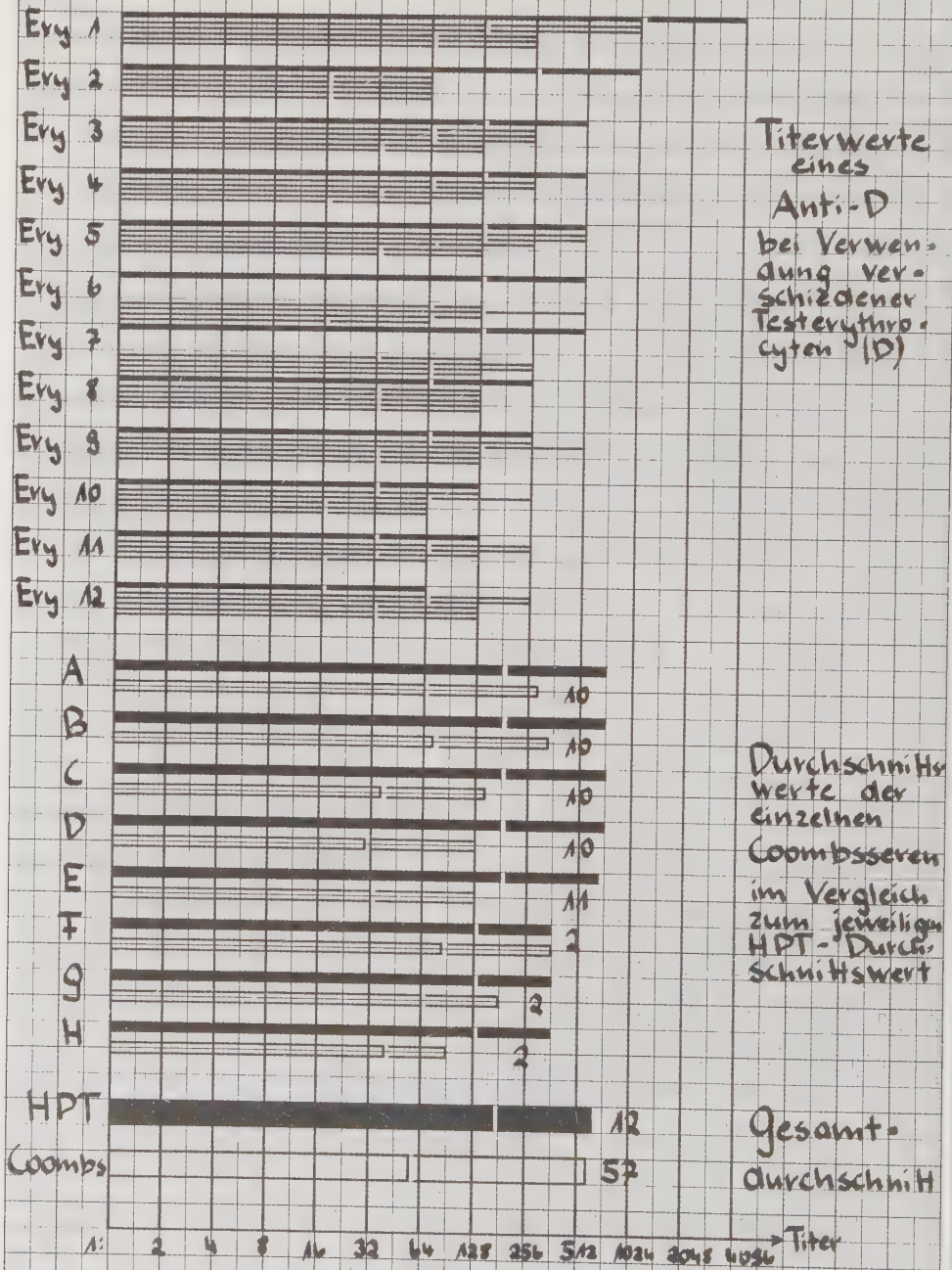
Als bestes Anti-Human-Globulin-Serum ergibt sich das Coombs-Serum "G"; der mit diesem Serum erreichte Titerwert unterscheidet sich im Durchschnitt nur gering von dem mit dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test erreichten. Der durchschnittlich erreichte Titerwert des nach W. Schneider modifizierten Hochprotein-Slide-Testes ist 1028, der des indirekten Objektträger-Coombs-Testes 373, einem Titerunterschied von 1-2 Stufen entsprechend. Der mit dem indirekten Röhrchen-Coombs-Test durchschnittlich erreichte Wert ist 118, also 1-2 Stufen niedriger als der mit dem Objektträger-Coombs-Test erreichte Wert. (Tab.: 3 und 4)

ad 3. Anti-D-Serum von S. gegen verschiedene D-Erythrocyten:

Dasselbe Anti-D-Serum kreuzen wir in 12 Versuchen nach dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test und in 57 Versuchen nach dem indirekten Objektträger-Coombs-Test mit 12 verschiedenen D-Erythrocyten. Der indirekte Objektträger-Coombs-Test ergibt in 2 Fällen um 2 Stufen und in 7 Fällen um 1 Stufe bessere Ergebnisse, in 6 Fällen gleiche, in 20 Fällen um 1 Stufe, in 12 Fällen um 2 Stufen, in 2 Fällen um 3 Stufen und in 8 Fällen um 4 Stufen schlechtere Ergebnisse.

Das beste Coombs-Serum ist hier das Anti-Human-Globulin-Serum "F". Als durchschnittlich erreichter Titerwert ergibt sich bei dem nach W. Schneider modifizierten Hochprotein-Slide-Test 688, bei dem indirekten Objektträger-Coombs-Test 611. Der mit dem indirekten Röhrchen-Coombs-Test erreichte Wert ist durchschnittlich 61, etwa 3 Stufen niedriger als der Durchschnittswert des Objektträger-Coombs-Testes. (Tab.: 5)

Tab. 5



Titerwerte eines Anti-D bei Verwendung verschiedener Testerythrocyten (D)

Durchschnittswerte der einzelnen Coombsseren im Vergleich zum jeweiligen HPT-Durchschnittswert

Gesamtdurchschnitt

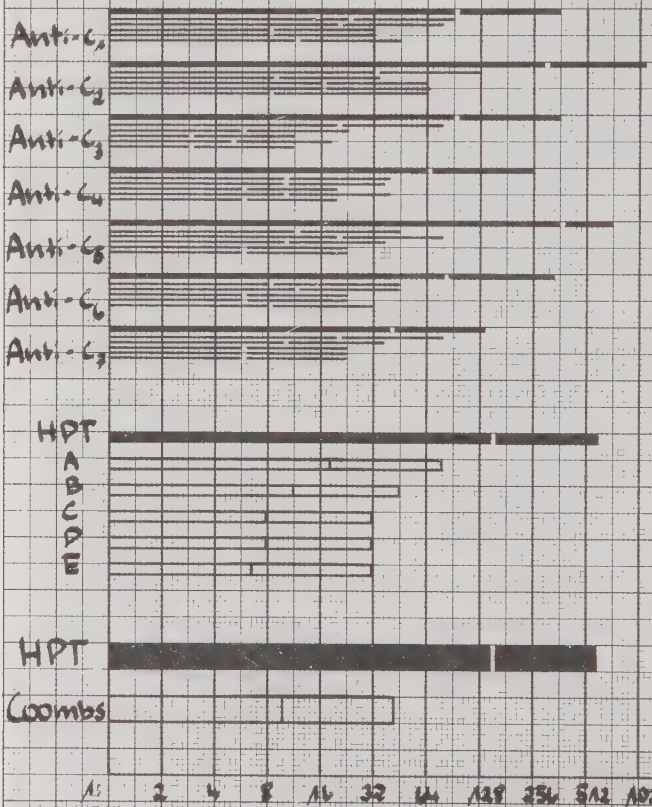
II. Anti-C-Serum gegen C-Erythrocyten:

Da wir bei der Untersuchung des Anti-D-Serums von S. sahen, wie unterschiedlich die Titerwerte desselben Anti-D-Serums bei der Kreuzung mit verschiedenen D-Erythrocyten ausfielen, bestimmen wir in den noch folgenden Versuchsreihen mit Anti-C, Anti-c, Anti-E und Anti-e den Titerwert des betreffenden Antikörper-Serums immer gegenüber 2 verschiedenen Erythrocyten und verwenden als Ergebnis den daraus errechneten Mittelwert. Auf Homo- oder Heterozygotie der Erythrocyten wurde dabei nicht geachtet.

In der Versuchsreihe mit Anti-C gehen wir von 7 verschiedenen Anti-C-Seren der Industrie aus. Wie bei der Untersuchung der Anti-D-Seren legen wir zunächst eine geometrische Verdünnungsreihe des antikörperhaltigen Serums mit antikörperfreiem AB-Serum bis zur Stufe 1 : 2000 an, jedoch mit der doppelten Menge an Serum. Die 1. Verdünnungsstufe erhalten wir also durch Mischen von 0,8 ml Anti-C-Serum mit 0,8 ml AB-Serum. Jede Verdünnungsstufe wird nun 2mal nach dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test mit den 2 %igen Suspensionen 2er verschiedener C-Erythrocyten in 20 %igem Rinderalbumin und 2mal nach dem indirekten Coombs-Verfahren mit den 10 %igen Suspensionen derselben 2 C-Erythrocyten in physiologischer Kochsalzlösung gekreuzt.

Ergebnisse: Nach Errechnen der Mittelwerte aus den Versuchen mit einem Anti-C-Serum und 2 verschiedenen C-Erythrocyten erhalten wir 7 Mittelwerte des nach W. Schneider modifizierten Hochprotein-Slide-Testes und 35 Mittelwerte

Tab. 6



Mittelwerte aus jeweils 2 Versuchen mit gleichem Anti-C und verschiedenen Erythrocyten

Durchschnittswerte der einzelnen Coombsseren im Vergleich zum HPT-Durchschnitt

Gesamt-Durchschnitt

des indirekten Objektträger-Coombs-Testes. Der indirekte Objektträger-Coombs-Test ist hier in 1 Versuch um 1 Stufe, in 6 Versuchen um 2 Stufen, in 12 Versuchen um 3 Stufen, in 11 Versuchen um 4 Stufen und in 5 Versuchen um 5 Stufen schlechter als der Hochprotein-Slide-Schaukel-Test.

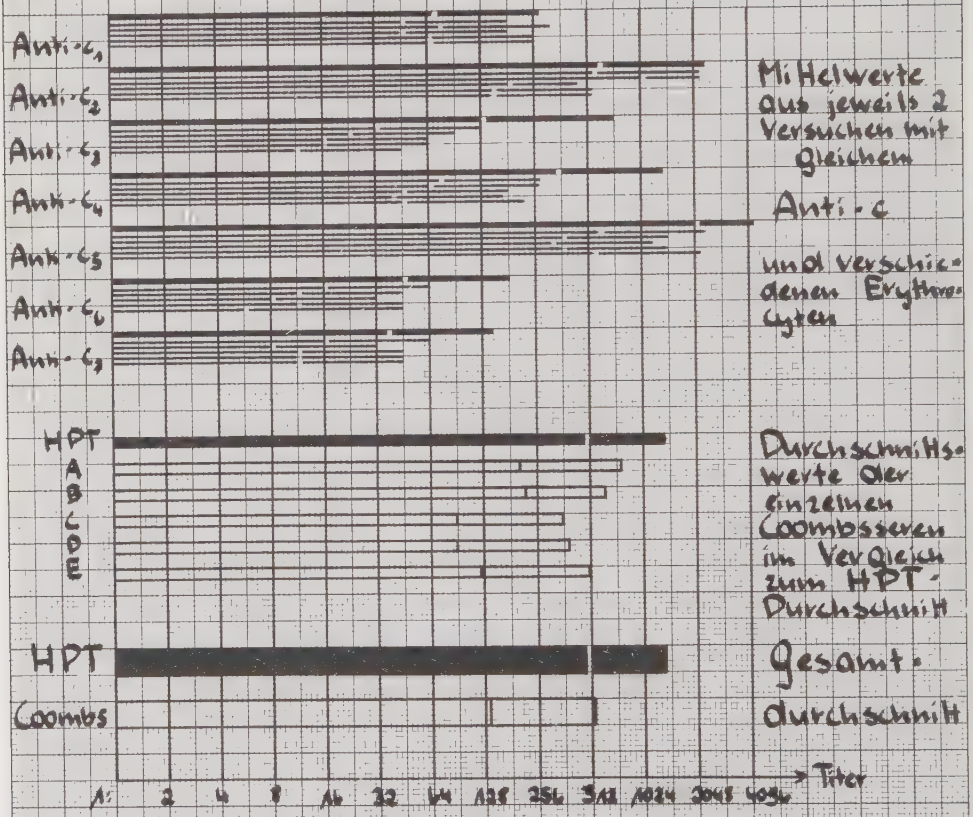
Die mit dem Coombs-Serum "A" durchgeführten Objektträger-Coombs-Teste kommen dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test in der Empfindlichkeit am nächsten. Der durchschnittlich erreichte Titerwert des Hochprotein-Slide-Schaukel-Testes ist 599, der des indirekten Objektträger-Coombs-Testes 45; der Objektträger-Coombs-Test liegt also um etwa 4 Stufen niedriger als der Hochprotein-Slide-Schaukel-Test. Der durchschnittlich erreichte Titerwert des indirekten Röhrchen-Coombs-Testes ist 25, rund 1 Stufe tiefer als der Objektträger-Coombs-Test. (Tab.: 6)

Die Werte sind nach dem Schema der vorhergehenden Tabellen aufgezeichnet, wobei die arabischen Ziffern wieder die Antikörper-Seren der verschiedenen Firmen und die großen Buchstaben die einzelnen Coombs-Seren kennzeichnen.

III. Anti-c-Serum gegen c-Erythrocyten:

Wie in der vorhergehenden Versuchsreihe verwenden wir wieder 7 verschiedene Anti-c-Seren der Industrie. Die einzelnen Verdünnungsstufen kreuzen wir ebenfalls mit 2 verschiedenen c-Erythrocyten nach dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test und nach dem indirekten Coombs-Test. Aus den mikroskopisch abgelesenen Titerwerten zweier Versuche mit 1 Anti-c errechnen wir dann den Mittelwert für jedes Verfahren.

Tab. 7


Anti-c1
Anti-c2
Anti-c3
Anti-c4
Anti-c5
Anti-c6
Anti-c7
HPT
A
B
C
D
E
HPT
Coombs
1:
2
4
8
16
32
64
128
256
512
1024
2048
4096
→ Titer
Mittelwerte aus jeweils 2 Versuchen mit gleichem Anti-c und verschiedenen Erythrozyten
Durchschnittswerte der einzelnen Coombsseren im Vergleich zum HPT-Durchschnitt
Gesamtdurchschnitt

Ergebnisse: Der indirekte Objektträger-Coombs-Test kommt in 5 Fällen dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test in der Empfindlichkeit gleich, in 6 Fällen ist er ihm um 1 Stufe, in 17 Fällen um 2 Stufen, in 6 Fällen um 3 Stufen und in 1 Fall um 4 Stufen unterlegen.

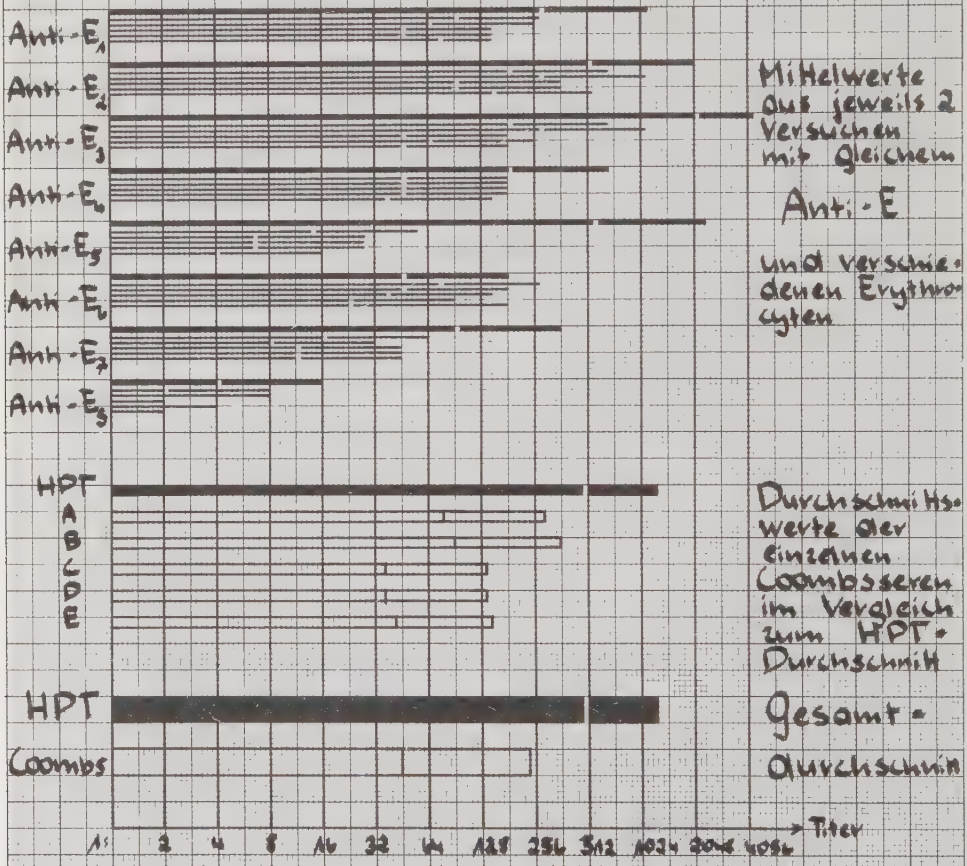
Dem nach W. Schneider modifizierten Hochprotein-Slide-Test in seiner Leistung am nächsten kommt der mit dem Coombs-Serum "A" durchgeführte indirekte Objektträger-Coombs-Test. Die im Durchschnitt erreichte Titerhöhe des Hochprotein-Slide-Schaukel-Testes ist 1416, die des indirekten Objektträger-Coombs-Testes 543, einem Titerunterschied von etwa 1 Stufe entsprechend. Der indirekte Röhrchen-Coombs-Test erreichte durchschnittlich eine Titerhöhe von 150, also 1-2 Stufen niedriger als der Objektträger-Coombs-Test. (Tab.: 7)

IV. Anti-E-Serum gegen E-Erythrocyten:

Auch hier führen wir die Kreuzproben mit 7 Anti-E-Seren der Industrie und mit 1 unausgewählten Anti-E-Serum, das bei einer Kreuzprobe in der Blutzentrale gefunden wurde, in doppelter Ausführung gegen 2 verschiedene E-Erythrocyten durch und verwenden für jedes Verfahren die Mittelwerte aus 2 Versuchen mit gleichem Anti-E-Serum und verschiedenen E-Erythrocyten.

Ergebnisse: In 1 Versuch erweist sich der indirekte Objektträger-Coombs-Test um 1 Stufe empfindlicher, in 2 Versuchen gleich empfindlich, in 4 Versuchen um 1 Stufe, in 14 Versuchen um 2 Stufen, in 10 Versuchen um 3 Stufen,

Tab. 8


Anti-E1
Anti-E2
Anti-E3
Anti-E4
Anti-E5
Anti-E6
Anti-E7
Anti-E8
HPT
A
B
C
D
E
HPT
Coombs
1:
2
4
8
16
32
64
128
256
512
1024
2048
4096
Titer
Mittelwerte aus jeweils 2 Versuchen mit gleichem Anti-E und verschiedenen Erythrozyten
Durchschnittswerte der einzelnen Coombsseren im Vergleich zum HPT-Durchschnitt
Gesamt-Durchschnitt

in 1 Versuch um 4 Stufen, in 3 Versuchen um 5 Stufen, in 3 Versuchen um 6 Stufen und in 1 Versuch um 7 Stufen schlechter als der Hochprotein-Slide-Schaukel-Test.

Als bestes Anti-Human-Globulin-Serum erweist sich das Coombs-Serum "B". Die durchschnittlich erreichte Titerhöhe des nach W. Schneider modifizierten Hochprotein-Slide-Testes ist 1410, die des indirekten Objektträger-Coombs-Testes 245, was rund 2 Titerstufen im Unterschied macht. Die Titerhöhe des indirekten Röhrchen-Coombs-Testes ist durchschnittlich 78, etwa 2 Stufen niedriger als die des Objektträger-Testes. (Tab.: 8)

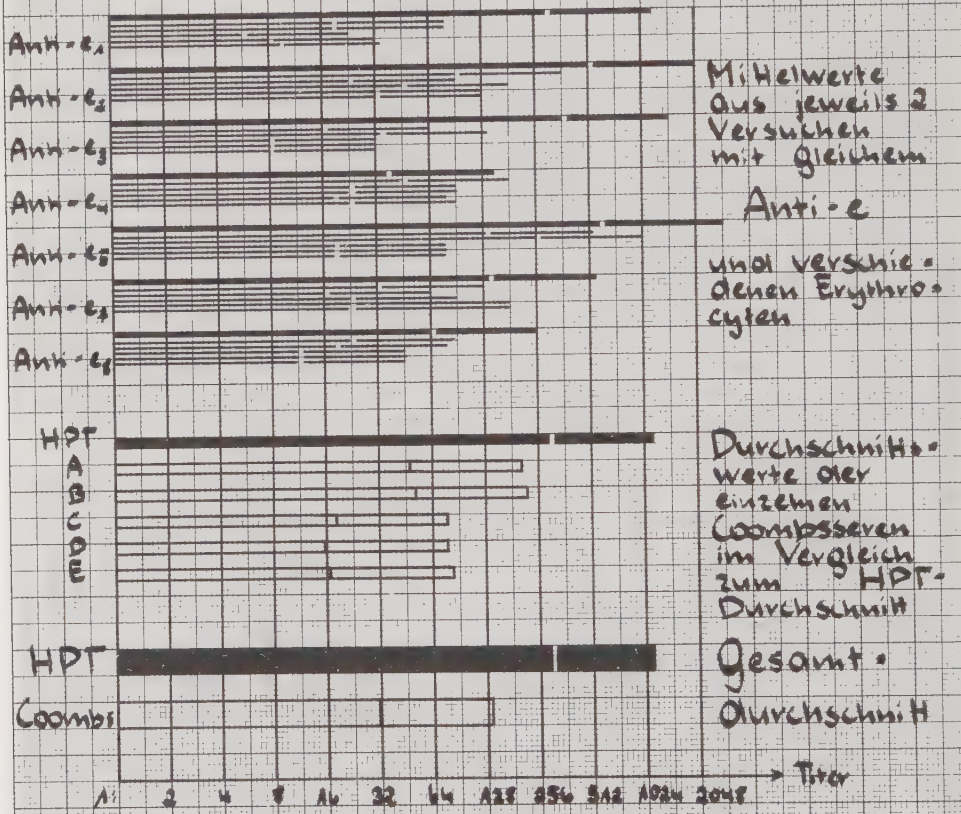
V. Anti-e-Serum gegen e-Erythrocyten:

Nach dem beschriebenen Prinzip werden wieder 7 Anti-e-Seren der Industrie gegen 2 verschiedene e-Erythrocyten gekreuzt und die Mittelwerte aus den erreichten Titerhöhen beider Verfahren verglichen.

Ergebnisse: In 1 Fall kommt der indirekte Objektträger-Coombs-Test dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test in der Leistung gleich, in 6 Fällen ist er ihm um 1 Stufe, in 9 Fällen um 2 Stufen, in 4 Fällen um 3 Stufen, in 6 Fällen um 4 Stufen, in 8 Fällen um 5 Stufen und in 1 Fall um 6 Stufen unterlegen.

Dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test in der Empfindlichkeit am nächsten kommen die mit dem Coombs-Serum "B" durchgeführten indirekten Objektträger-Coombs-Teste. Die durchschnittlich erreichte Titerhöhe des nach W. Schneider modifizierten Hochprotein-Slide-Testes ist 1194, die des in-

Tab. 9


Anti-e1
Anti-e2
Anti-e3
Anti-e4
Anti-e5
Anti-e6
Anti-e7
HPT
A
B
C
D
E
HPT
Coombs
1
2
4
8
16
32
64
128
256
512
1024
2048
Titer
Mittelwerte aus jeweils 2 Versuchen mit gleichem Anti-e und verschiedenen Erythrocyten
Durchschnittswerte der einzelnen Coompsseren im Vergleich zum HPT-Durchschnitt
Gesamt-Durchschnitt

direkten Objektträger-Coombs-Testes 139, einem Titerunterschied von rund 3 Stufen entsprechend. Der durchschnittlich erreichte Titerwert des indirekten Röhrchen-Coombs-Testes ist 48, 1-2 Stufen niedriger als der des Objektträger-Coombs-Testes. (Tab.: 9)

Zusammenfassung und Diskussion

Diese Arbeit war als die Fortsetzung der Untersuchungen von W. Schneider und P. Cornils gedacht, welche ergaben, daß die Empfindlichkeit des Hochprotein-Slide-Testes steigt, wenn das Reaktionsgemisch während der gesamten Inkubationszeit bewegt wird, und zwar im Bereich des ABO-Systems durchschnittlich um 1 Verdünnungsstufe und im Bereich des Rh-Systems um 2 Verdünnungsstufen einer geometrischen Verdünnungsreihe des antikörperhaltigen Serums. Wir fragten uns nun, wie weit dieser nach W. Schneider modifizierte Hochprotein-Slide-Test, der Hochprotein-Slide-Schaukel-Test, dem zur Zeit als bestes Kreuzverfahren empfohlenen indirekten Coombs-Test in der Empfindlichkeit nahe kommt, wenn es sich um die Erkennung von Antikörpern des Rh-Systems handelt.

Der Leistungsvergleich wurde durchgeführt zwischen:

a.) dem nach W. Schneider modifizierten Hochprotein-Slide-Test, der über die Dauer der Inkubation mit Hilfe eines für diesen Zweck konstruierten Schaukelgerätes in ständiger Bewegung gehalten wurde, und

b.) dem indirekten Objektträger-Coombs-Test nach der bereits beschriebenen Methode.

Unsere Untersuchungen wurden alle mit antikörperhaltigen Seren des Rh-Systems durchgeführt, also mit den Antikörpern Anti-D, Anti-C, Anti-c, Anti-E und Anti-e. Wir setzten 104 Versuchsreihen, bestehend aus insgesamt 1248 Kreuzproben, nach dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Verfahren an und ver-

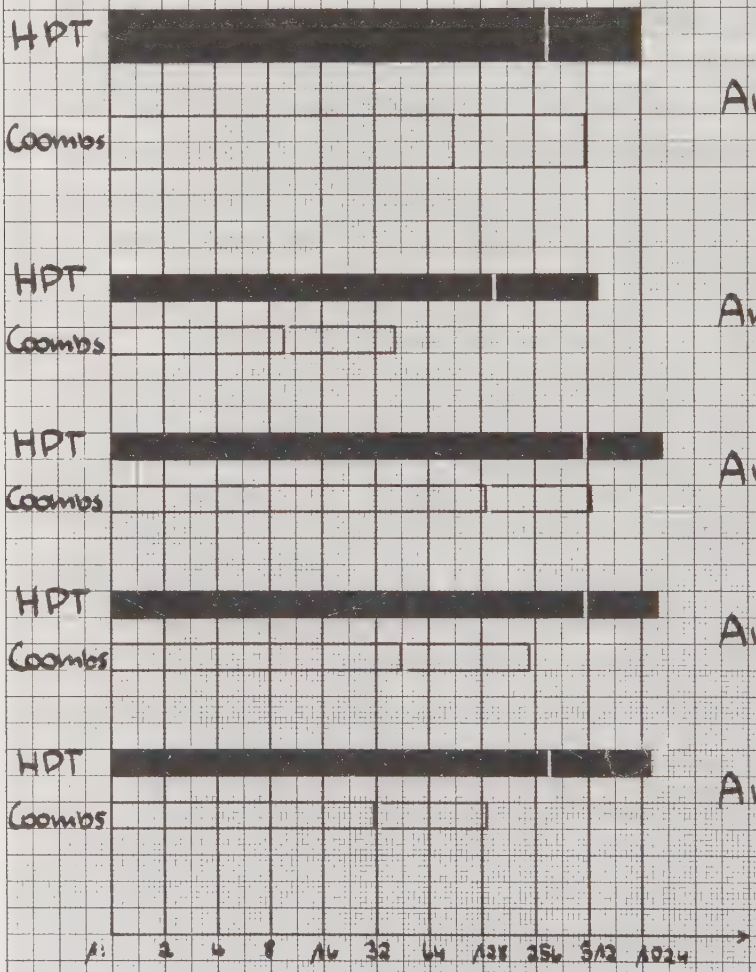
glichen diese mit den dazugehörigen indirekten Objektträger-Coombs-Testen, welche wir mit mehreren Anti-Human-Globulin-Seren verschiedener Firmen durchführten, um Aussagen über die Leistungsfähigkeit der einzelnen Coombs-Seren machen zu können. Wir konnten also die Ergebnisse von 499 Versuchsreihen mit insgesamt 5988 Kreuzproben nach dem indirekten Objektträger-Coombs-Verfahren beurteilen. Außerdem führten wir in jedem Versuch noch einen indirekten Röhrchen-Coombs-Test mit und verglichen diesen mit dem indirekten Objektträger-Coombs-Test.

Wir kamen zu folgenden Ergebnissen:

1) Der nach W. Schneider modifizierte Hochprotein-Slide-Test erwies sich im Nachweis eines Anti-D durchschnittlich um 1 Stufe, eines Anti-C um 4 Stufen, eines Anti-c um 1 Stufe, eines Anti-E um 2 Stufen und im Nachweis eines Anti-e um durchschnittlich 3 Stufen einer geometrischen Verdünnungsreihe der antikörperhaltigen Seren empfindlicher als der indirekte Objektträger-Coombs-Test. (Tab.: 10)

Im Einzelfall ergaben sich Stufenunterschiede zugunsten des Hochprotein-Slide-Schaukel-Testes (H.P.S.S.T.) bei der Untersuchung des Anti-D bis zu 7 Stufen, zugunsten des Objektträger-Coombs-Testes bis zu 4 Stufen, bei Anti-C zugunsten des H.P.S.S.T. bis zu 5 Stufen, zugunsten des Coombs-Testes bis zu 1 Stufe, bei Anti-c zugunsten des H.P.S.S.T. bis zu 4 Stufen, der Coombs-Test übertraf hier in keinem Fall den H.P.S.S.T., bei Anti-E zugunsten des H.P.S.S.T. bis zu 7 Stufen, zugunsten des Coombs-Testes bis zu 1 Stufe,

Tab.: 10


HDT
Coombs
Anti-D
HDT
Coombs
Anti-C
HDT
Coombs
Anti-c
HDT
Coombs
Anti-E
HDT
Coombs
Anti-e
1:
2
4
8
16
32
64
128
256
512
1024
Titer

bei Anti-c zugunsten des H.P.S.S.T. bis zu 6 Stufen, auch hier übertraf der indirekte Objektträger-Coombs-Test den H.P.S.S.T. in keinem Fall. Im Durchschnitt gesehen war der H.P.S.S.T. im Nachweis von Antikörpern des Rh-Systems leistungsfähiger als der indirekte Objektträger-Coombs-Test.

2) Weiter stellten wir fest, daß der indirekte Objektträger-Coombs-Test mit Coombs-Seren verschiedener Firmen durchaus nicht gleich empfindlich ausfällt; teilweise bestanden grössere Schwankungen bei der Untersuchung desselben Antigen-Antikörper-Gemisches mit verschiedenen Anti-Human-Globulin-Seren. Beispielsweise kamen in der Versuchsreihe mit den Firmen-Anti-D-Seren die mit dem Coombs-Serum "G" durchgeführten Kreuzproben durchschnittlich bis auf 1 Stufe an den H.P.S.S.T. heran, die mit Coombs-Serum "F" durchgeführten nur bis auf 3 Stufen; bei den unausgewählten Anti-D-Seren kamen die mit Coombs-Serum "G" durchgeführten indirekten Objektträger-Coombs-Teste dem H.P.S.S.T. in der Empfindlichkeit gleich, während die mit Coombs-Serum "C" durchgeführten um 2 Stufen zurückblieben; bei der Versuchsreihe mit dem Anti-D-Serum von S. waren die mit Coombs-Serum "F" durchgeführten Coombs-Teste wiederum gleich empfindlich wie der H.P.S.S.T., während die mit Coombs-Serum "D" durchgeführten um 2 Stufen abfielen.

Wir wollen damit zeigen, daß die Empfindlichkeit des indirekten Coombs-Testes von verschiedenen Faktoren abhängig ist, nämlich von der Herstellungsqualität und Gebrauchsverdünnung der verwendeten Anti-Human-Globulin-Seren, die bei

den einzelnen Firmen anders ausfällt und sogar innerhalb der Chargen differiert, außerdem aber noch von der jeweiligen Antikörpereigenschaft und den agglutinablen Eigenschaften der jeweiligen Testerythrocyten.

3) In allen Fällen unterlag der indirekte Röhrchen-Coombs-Test, der nur makroskopisch vor einer Lichtquelle beurteilt werden konnte, dem mikroskopisch ablesbaren indirekten Objektträger-Coombs-Test, und zwar waren die Ergebnisse bei den Untersuchungen von Anti-D-Serum durchschnittlich um 2 Stufen, von Anti-C-Serum um 1 Stufe, von Anti-c-Serum um 1-2 Stufen, von Anti-E-Serum um 2 Stufen und von Anti-e-Serum um 1-2 Stufen einer geometrischen Verdünnungsreihe der antikörperhaltigen Seren schlechter.

Wie aus unseren Ergebnissen zu ersehen ist, reagiert der Hochprotein-Slide-Schaukel-Test in der größeren Zahl der Versuche empfindlicher im Nachweis von Rh-Antikörpern als der indirekte Objektträger-Coombs-Test. Weiterhin hat er seine Vorteile in dem einfachen, schnell durchführbaren Untersuchungsgang gegenüber dem langwierigen indirekten Coombs-Test, der das 3-4fache an Arbeitszeit beansprucht. In dringenden Fällen wäre demnach der Hochprotein-Slide-Schaukel-Test dem indirekten Coombs-Test als Kreuzverfahren durchaus vorzuziehen. Da sich aber in einzelnen Fällen der indirekte Coombs-Test als leistungsfähiger erwies, empfiehlt es sich, zum exakten Nachweis des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins eines Antikörpers des Rh-Systems gleichzeitig mit dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test einen indirekten

Coombs-Test anzusetzen, der dann möglichst mit mehreren Coombs-Seren verschiedener Gebrauchsverdünnung durchgeführt wird, um die darauf beruhenden Empfindlichkeitsschwankungen voll zu erfassen.

Eine weitere Arbeit über die Stellung des Hochprotein-Slide-Schaukel-Testes nach W. Schneider unter den derzeit gängigen Kreuzverfahren zum Nachweis von Antikörpern innerhalb anderer Blutgruppensysteme wird zur Zeit durchgeführt.

Literaturverzeichnis

1) Levine P. and Stetson R.E.

An Unusual Case of Intra-Group Agglutination

J.A.M.A. 113: 126, 1939

2) Levine P., Katzin E.M. and Burnham L.

Isoimmunization in Pregnancy; its Possible Role in the Pathogenesis of Erythroblastosis Fetalis

J.A.M.A. 116: 825, 1941

3) Wiener A.S. and Peters H.R.

Hemolytic Reactions Following Transfusion of Blood of the Homologous Group

Ann. Int. Med. 13: 2306, 1940

4) Landsteiner K. and Wiener A.S.

An Agglutinable Factor in Human Blood Recognized by Immune Sera for Rhesus Blood

Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 43: 223, 1940

5) Deutsche Gesellschaft für Blut-Transfusion

Das Blut-Transfusionswesen

Friedrich-Karl-Schattauer-Verlag, Stuttgart 1963

6) Holländer

Anaesthesist 1: 142, 1952

7) Mollison P.L.

Blood Transfusion in Clinical Medecine

Oxford: Blackwell Scientific Publications 1951

8) Dahr P.

Technik der Blutgruppen- und Blutfaktorenbestimmung

6. Auflage, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1953

9) Dahr P.

Ergebn. Hyg. Bakt. 29: 84, 1955

10) Dahr P. und Regenbogen E.

Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion

2. Auflage, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1952

11) Speiser P. und Kaserer O.

Wien: med. Wschr. 103: 440, 1953

12) Bergmann H.

Wien: med. Wschr. 105: 502, 1955

13) Braune J.-F.

Ärztl. Wschr. 11: 982, 1956

14) Rundfrage: Serological Aspects in Blood Transfusion

Vox Sang. (Basel) N.S. 1: 207, 1956

15) Moreschi C.

Neue Tatsachen über die Blutkörperchenagglutination

Zentr. Bakteriol. Parasitenk. 46: 49, 1908

16) Coombs R.R.A., Mourant A.E. and Race R.R.

Detection of Weak and "Incomplete" Rh Agglutinins: A New Test

Lancet 2: 15, 1945

17) Coombs R.R.A., Mourant A.E. and Race R.R.

A New Test for the Detection of Weak and "Incomplete" Rh Agglutinins

Brit. J. Exp. Path. 26: 255, 1945

18) Wheeler W.E., Lubby A.L. and Scholl M.L.L.

The Actions of Enzymes in Hemagglutinating Systems. II. Agglutinating Properties of Trypsin-Modified Red Cells with Anti-Rh Sera

J. Immunol. 65: 39, 1950

19) Morton J.A. and Pickles M.M.

Use of Trypsin in the Detection of Anti-Rh Antibodies

Nature 159: 779, 1947

20) Kuhns W.J. and Bailey A.

Use of Red Cells Modified by Papain for Detection of Rh Antibodies

Am. J. Clin. Path. 20: 1067, 1950

21) Wiener A.S. and Katz L.

Studies on the Use of Enzyme-Treated Red Cells in Tests for Rh Sensitization

J. Immunol. 66: 51, 1951

22) Pirkofsky B. and Mangum M.

The Use of Bromelin to Demonstrate Erythrocyte Antibodies

Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 101: 49, 1959

23) Hummel K.

Inkomplette blutgruppenserologische Reaktionssysteme

Die ärztl. Fortbildung 11: 597, 1966

24) Dahr P.

Med. Welt 127, 1962

25) Kindler M.

Lab. Blätter, Behringwerke 1963

Tabellarischer Anhang

I. Erreichte Titerhöhen mit dem Hochprotein-Slide-Schaukel-Test und dem indirekten Coombs-Test:

Anti-D-Serum gegen D-Erythrocyten

1. Firmen-Anti-D-Serum:

	1	1	1	2	3	5	7
H.P.S.T.	512	2048	4096	1024	512	1024	512
O-Coombs-T.:							
A			2048	256			
D			512	128	256	1024	
E		32			256	1024	
F		256					
G	512	256	2048	256	512	2048	128
H		128	512	128	256	1024	16
R-Coombs-T.:							
mit G	256	128	256	128	128	512	64

2. Unausgewählte Anti-D-Seren:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
H.P.S.T.	32	4096	512	2048	256	4096	512	128	256
O-Coombs-T.:									
A		4096	512	2048	8	512	128	64	128
B			2048	512	128	512	256	128	128
C			64	512	8	512	128	16	64
D		2048	64	1024	8	256	64	16	64
E	16		64	1024	4	256	64	16	64
F	16								
G	32	4096							
H	8	1024							
R-Coombs-T. mit A	8	1024	128	512	2	256	64	16	64

	10	11	12	13	14	15	16	17	18
H.P.S.T.	4096	256	128	8	8	4096	256	128	4096
O-Coombs-T.:									
A	1024	128	256	8	8	2048	16	128	64
B	2048	128	128	4	4	2048	8	256	64
C	512	64	128	2	2	2048	8	128	32
D	512	64	256	4	2	2048	4	128	32
E	256	64	256	2	0	2048	4	64	
F									
G									
H									
R-Coombs-T. mit A	256	64	64	2	2	256	2	64	32

	19	20	21	22	23	24	25	26	27
H.P.S.T.	16	16	32	2048	512	64	8	8	32
O-Coombs-T.:									
A	2	16	2	2048	512	64	64	16	64
B	4	32	2	1024	256	32	64	16	64
C	0	16	0	1024	256	64	32	8	32
D	2	16	2	512	512	32	64	8	16
E									
F									
G				1024	1024	128	128	16	32
H									
R-Coombs-T. mit A	0	4	0	256	64	32	8	2	8

3. Anti-D-Serum von S.:

Ery	1	2	3	4	5	6	7
H.P.S.T.	4096	1024	512	512	512	512	256
O-Coombs-T.:							
A	1024	64	256	256	512		
B	1024	64	256	256	512		
C	256	64	256	128	256		
D	256	64	128	128	128		
E	256	64	128	64	128	128	128
F						512	256
G						128	256
H						64	128
R-Coombs-T. mit A	128	16	64	64	128	64	64

Ery	8	9	10	11	12
H.P.S.T.	256	256	128	128	64
O-Coombs-T.:					
A	128	256	128	256	256
B	128	512	256	256	256
C	128	128	64	128	128
D	128	128	64	64	128
E	128	128	64		128
F					
G					
H					
R-Coombs-T. mit A	32	32	16	64	64

II. Mittelwerte der erreichten Titerhöhen aus jeweils 2 Versuchen mit gleichem Anti-C-Serum und verschiedenen C-Erythrocyten:

	1	2	3	4	5	6	7
H.P.S.T.	384	1152	384	256	1536	320	160
O-Coombs-T.:							
A	96	132	80	41,5	48	48	80
B	80	36	24	40	80	48	40
C	32	66	12	22	40	24	24
D	32	68	20	41,5	24	24	24
E	48	66	12	22	24	32	24
R-Coombs-T. mit A	24	33	31	10,5	40	24	12

III. Mittelwerte der erreichten Titerhöhen aus jeweils 2 Versuchen mit gleichem Anti-c-Serum und verschiedenen c-Erythrocyten:

	1	2	3	4	5	6	7
H.P.S.T.	288	2560	768	1447	4500	192	160
O-Coombs-T.:							
A	192	2304	128	299	2560	64	64
B	320	2176	96	289	1536	48	32
C	192	768	64	192	1280	32	48
D	256	640	64	171	1536	48	48
E	256	640	48	213	2304	48	48
R-Coombs-T. mit A	32	320	48	74,6	544	16	16

IV. Mittelwerte der erreichten Titerhöhen aus jeweils 2 Versuchen mit gleichem Anti-E-Serum und verschiedenen E-Erythrocyten:

	1	2	3	4	5	6	7	9
H.P.S.T.	1152	2048	4500	768	2219	192	384	16
O-Coombs-T.:								
A	320	768	768	192	53	288	64	8
B	256	1152	1152	192	29	192	32	8
C	160	384	192	192	28	160	48	2
D	160	384	256	192	28	96	48	4
E	160	576	192	160	17	192	48	2
R-Coombs-T. mit A	96	128	288	48	9	48	16	4

V. Mittelwerte der erreichten Titerhöhen aus jeweils 2 Versuchen mit gleichem Anti-e-Serum und verschiedenen e-Erythrocyten:

	1	2	3	4	5	7	8
H.P.S.T.	1280	2048	1536	160	2500	576	256
O-Coombs-T.:							
A	80	384	64	192	544	128	96
B	80	96	144	96	1040	64	80
C	24	192	32	96	80	96	48
D	32	128	32	80	80	192	48
E	40	128	32	96	80	192	48
R-Coombs-T. mit A	20	96	24	48	80	48	24

An dieser Stelle möchte ich
Herrn Prof. Dr. med. W. Dick für
die Erlaubnis danken, diese Untersuchungen
in der Chirurgischen Universitätsklinik
Tübingen durchführen zu dürfen.

Danken möchte ich auch
Herrn Dozent Dr. med. W. Schneider
für die Themastellung, sein Interesse am
Fortgang der Arbeit, sowie für die Übernahme
des Referates.

Ferner sei allen Mitarbeitern von
Herrn Dozent Dr. med. W. Schneider
für ihre Hilfeleistungen im Labor gedankt.

Lebenslauf

Am 31. Oktober 1944 wurde ich, Helga Sauter, als Tochter des Dr. med. Hans-Dietrich Sauter und seiner Frau Ilse, geborene Eberle, in Tübingen geboren. Ich wurde im Elternhaus erzogen. Von September 1950 bis Ostern 1954 besuchte ich die Grundschule in Tübingen, von Ostern 1954 bis 1956 das Uhland-Gymnasium in Tübingen. Im Mai 1956 ließ sich mein Vater als praktischer Arzt in Lonsingen nieder. Ich besuchte daher von Mai 1956 bis Ostern 1960 das Progymnasium in Urach, darauf von Ostern 1960 bis Frühjahr 1963 das naturwissenschaftliche Gymnasium in Metzingen, wo ich am 21. Februar 1963 die Reifeprüfung bestand. Am 2. Mai 1963 immatrikulierte ich mich an der Universität in Tübingen, wo ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung am 10. April 1964, die ärztliche Vorprüfung am 16. Oktober 1965 und die ärztliche Prüfung am 15. Februar 1969 ablegte.